B−40 徳島県内一般事業所排水に対するWET試験と放流先ミキシングゾーン端での毒性影響評価

○池幡　佳織[1]・安部　香緒里[1]・安田　侑右[1]・平田　佳子[1]・田村　生弥[1]・
中村　友紀[2]・鑪迫　典久[3]・山本　裕史[4]*

[1]徳島大学大学院　総合科学教育部（〒770-8502 徳島県徳島市南常三島町1-1）

[2]徳島県保健環境センター（〒770-0941 徳島県徳島市万代町5-71）

[3]国立環境研究所環境リスク研究センター（〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2）

[4]徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンドサイエンス研究部（〒770-8502 徳島県徳島市南常三島町1-1）
＊ E-mail: *hiroshi@ias.tokushima-u.ac.jp*

1. はじめに

現在全世界で使用されている化学物質は10万種にも上るとされ，事業所からの排出される排水のリスク評価・管理において，従来の個別物質ごとの評価・管理では，分析コスト増加の問題や未知の化学物質の影響，個別の化学物質間の複合的な影響などに対応できていない．この問題を解決する方法として，米国では環境保護庁(USEPA)が1995年に水生生物に対して排水を直接曝露し，その影響を評価し削減するWhole Effluent Toxicity（WET：全排水毒性）規制を導入[1]した．2011年には隣国の韓国[2]も同様の規制を導入予定で，日本でも従来の排水規制を補完する役割として平成21年度から環境省が導入に向けた検討を開始[3]している．しかし，国内ではWET手法をベースにしたバイオアッセイを事業所排水に適用した例は非常に少ない[4-6]．また，実際のWET手法の国内導入に向けて放流先ミキシングゾーンでの毒性影響の評価・管理の概念を国内の従来の一律規制[7]等のシステムにどう当てはめていくかに問題がある．そこで本研究ではUSEPAのガイドラインを参考に徳島県内5カ所（A, B, C, D, E）の水質汚濁防止法対象の特定事業場を対象に，水生生物3種（緑藻類，甲殻類，魚類）を用いて亜慢性毒性を調べるとともに，放流先ミキシングゾーン端での毒性影響の評価を行った．なお，本研究では放流先河川の下流で、河川水と排水が十分混合したと考えられる地点をミキシングゾーン（混合域）端と仮定して検討を進めた。

2. 実験方法

(1)事業所の選定と採水

徳島県内の水質汚濁防止法対象の特定事業場のうち放流先河川が海域でない5か所を選定し、2009年10月−2010年2月に2回ずつ採水した．日内変動を考慮し，朝・昼・夕の3回流量比例コンポジットで採水し，4±2℃で冷蔵保存し，採水後36時間以内に各種毒性試験を開始した．また，排水の放流先河川（上流・下流）で各１回採水した．

(2) 水質項目の測定

pHは堀場製作所社製のD-55を，DO，水温，電気伝導度はHACH社製のHQ40d18を用いて排水や放流先河川の採取時にそれぞれ測定した．一方，COD，全窒素，全リンは，事業所の自動測定装置のデータを入手した．放流先河川のミキシングゾーン端での希釈倍率を算出するため，川幅，　水深，流速などを測定し，流量を算出した．

(3)各種毒性試験

藻類生長阻害試験は，USEPA-TG No.1003[8]に準拠し，単細胞緑藻類のムレミカヅキモ(*Pseudokirchneriella subcapitata*)（NIES-35株）を用いて試験を行った．三角フラスコ内に排水6濃度区（3.0〜97%：公比2倍）とブランクを用意し，河川水は培地を加え97%に調整し，各 4連で試験を行った．曝露期間は96時間として24時間毎に細胞数を測定し，24 - 96時間の生長阻害率のNOEC（最大無影響濃度）を算出した．

ミジンコ繁殖阻害試験は，USEPA-TG No.1002[9]に準拠し，生後 24 時間以内のニセネコゼミジンコ(*Ceriodaphnia dubia*)の幼体を用いて試験を行った．排水は 5 濃度区（6.3〜100 %：公比 2 倍）およびブランクを用意し，河川水は各 100%濃度のみで各濃度区 10 匹ずつ (1 容器 1 匹)曝露した．半止水式で曝露期間は 7(±1)日間とし，曝

露終了後，死亡した親ミジンコ数と3腹目までの累積産仔数を調べ，それぞれ7日間の半数致死濃度(LC50)と産仔数のNOECを算出した．

魚類の短期慢性毒性試験については，USEPA-TG No.1000[10]及びOECD-TG212[11]を参考に試験を行った．産卵後24時間以内のヒメダカ（*Oryzias latipes*）の卵を用い，排水はミジンコ同様に5濃度区およびブランク，河川水はそれぞれ100％濃度で12匹ずつ用意した．曝露期間はふ化後4日間までとし，曝露終了後にふ化率，致死率のNOECを算出した．

(4) ミキシングゾーンでの希釈効果の算出方法

放流口の上流，下流での流量がわかる場合は，その値を用いて希釈倍率を算出した．一部の流量の測定が困難な場合，電気伝導度を塩分濃度に換算し，単純なマスバランスを表す式(1)と(2)を式変形し，算出した．（なお、ここでCは濃度，Qは流量，下付きの1は事業所排水，2は上流，3は下流を示す．）

$$Q_1C_1+Q_2C_2=Q_3C_3 \qquad (1)$$

$$Q_1+Q_2=Q_3 \qquad (2)$$

(5) 毒性単位（ＴＵ）の算出方法

TU（毒性単位：Toxicity Unit)は，排水が各水生生物に対して影響を及ぼさないようになるまで希釈するために必要な倍率を示し，諸外国ではこのTUの値をもとに規制を実施している[12)13)]．藻類，ミジンコ，魚類について算出したNOECに基づき，亜慢性毒性のTUであるTUcを以下の式により算出した．

$$TUc=100/NOEC \qquad (3)$$

3 結果及び考察

(1) 各種水質項目試験結果

各事業所排水の水質測定結果を**表-1**に示す．概してpH，DOなどの値は河川の生活環境の保全に関する環境基準値の類型AA及びAを満たし良好な値であったが，水温は放流先河川よりも排水の方が高く，下流では水温上昇が認められる事業所が多かった．また，COD，T-Nなども，事業所Aの1回目でやや高かったものの，全て水質汚濁防止法による排水規制を十分満たした．電気伝導度については，事業所Bでやや高かったほかは，概して低かった．

表-1 事業所排水および放流先河川の一般水質項目と流量

			pH	温度 (℃)	DO (mg/L)	COD (mg/L)	T-N (mg/L)	T-P (mg/L)	電気伝導度 (μs/cm)	流量 (m³/h)
事業所A	1	排水 夕	7.79	24.8	7.38	10.0	12.3	4.97	776	42.6
		排水 朝	7.64			4.55	13.1	4.12		38.4
		排水 昼	7.95		7.11	4.22	13.9	2.46	764	39.0
		上流	8.20	19.0	10.7				192	
		下流	8.97	20.5	12.9				283	
	2	排水 夕				3.61	1.80	0.76		36.6
		排水 朝				3.67	1.50	0.97		33.6
		排水 昼	8.20	18.7	8.83	3.78	0.60	0.91	759	36.6
		上流	8.29	6.30	13.4				188	
		下流	8.82	10.3	13.8				425	
事業所B	1	排水 朝	7.38	21.1		2.34	1.80	0.06		66.0
		排水 昼	7.40	20.3		2.34	2.50	0.06		54.0
		排水 夕	7.33	21.0	6.60	2.42	0.70	0.06	5730	78.0
		上流	8.03	24.8	8.32				182	
		下流	7.81	24.8	8.19				173	
	2	排水 夕	7.55	19.5	9.42	3.72	2.10	0.05	5180	84.0
		排水 朝	7.47	19.6	7.52	3.39	2.30	0.05	5360	84.0
		排水 昼	7.55	19.7	8.84	4.01	2.40	0.05	5970	84.0
		上流	7.14	11.4	12.2				159	
		下流	7.69	11.4	13.1				176	
事業所C	1	排水 朝		20.1	6.20	3.70	1.58	0.31	304	51.0
		排水 昼				7.46	2.77	0.19		51.7
		排水 夕				6.05	2.25	0.20		46.8
		上流			8.62				230	70.0
	2	排水 朝	7.66	18.0	7.41	6.19	1.46	0.19	275	52.0
		排水 昼				5.67	1.31	0.20		53.0
		排水 夕	7.23	19.2	7.20	5.76	1.21	0.19	313	55.0
		上流	8.09	15.8	8.96				224	67.0
事業所D	1	排水 朝	7.43	18.5	7.52	0.03	2.00	0.01	454	450
		排水 夕	6.88	17.2	8.97				464	
		上流	7.07	23.4					3440	
		下流	7.04	23.4					3850	
	2	排水 朝	7.36	17.6	9.84		1.37	0.01	592	
		排水 夕	7.43	18.1	9.67				525	
		上流	7.21	15.9	7.69				1140	
		下流	7.14	12.7	6.53				790	
事業所E	1	排水 昼	7.79	22.5	7.69				1140	70.8
		上流	8.14	11.0	9.35				351	716
		下流	8.74	13.5	8.64				493	1670
	2	排水 朝	7.76	18.9	7.68				1060	
		上流	8.07	9.30	8.45				246	
		下流	9.29	11.0	8.62				385	

(2) 各種毒性試験結果

藻類生長阻害試験は，5箇所の中影響が観察されたのは事業所Eのみであった．1・2回目それぞれのTUcが8.3，17であった．一方，その他の多くの水試料は，排水濃度が高くなるほど生長阻害率の負の値が大きくなり，生長が促進された．生活排水を対象とした予備的調査[14)]でも，多くの排水で窒素・リン濃度と藻類の増殖率に弱い正の相関が認められ，生活排水由来の栄養塩等の物質が，藻類の生長を促進をさせたものと考えられる．また，毒性物質が存在する場合も，このような栄養塩類の存在は，毒性影響をマスキングする可能性がある．このことから，生活排水を含む排水については，使用培地も含めて栄養塩濃度を管理する必要があるほか，生物種として単独で用いる際には十分に注意するか，ほかの生物種と併用することが不可欠である．

ミジンコの繁殖阻害試験は，事業所Eの1回目，事業所Bの2回目は影響が認められなかったが，それ以外では，少なくとも高濃度排水で繁殖阻害が観察された．有害影響が最も大きかったのが事業所Dで，1・2回目ともに最低濃度の6.3%でも繁殖に顕著な影響が認められ、TUcが16となった．

ヒメダカの魚類短期慢性毒性試験は，事業所Cでは2回とも13%の排水で致死率に影響を及ぼし，TUcは16

となった．ほかにも，事業所B，DおよびEについても影響が観察された．

本研究では，国内導入を想定し，国内での情報量が多いヒメダカを用いて試験を実施したが，平均的な孵化日数が 7-10 日程度と米国や欧州での研究例が多いファットヘッドミノーやゼブラフィッシュよりも長い．排水試料の劣化という観点からもゼブラフィッシュを用いた試験系の可能性も今後検討を進めるべきである．

(3) 毒性単位(TU)とミキシングゾーン端での希釈効果

事業所排水についての毒性単位を算出した値を図-1に，各放流先のミキシングゾーン端での希釈倍率についての算出結果を表-2に示す．事業所Dについては，流量や電気伝導度の測定値から，放流先河川が感潮している可能性が示唆された．表-2に示すように，本研究でのミキシングゾーン端の希釈倍率は事業所A及びBは国内での標準的な希釈倍率として採用されている「10」を上回っていたが，その他の事業所では下回っていた．また，事業所Dは放流先河川の下流部でも顕著な影響が認められた．この事業所については，先述したようにミジンコの繁殖への影響が顕著であり，原因について聞き取りやモニタリングを実施するとともに，追加的処理の効果の検討など，いわゆる毒性削減評価(TRE)や毒性同定評価(TIE)[15]を実施することが望まれる．

なお，日本は米国などに比べて土地が狭く，事業所が密集しており，排水口が非常に近接して存在している事が多く，排水源を特定しにくい．このため，実際にミキシングゾーンを設定して規制を実施することは非常に困難で，排水だけでなく放流先河川の上流についてWET試験を行い，毒性影響のバックグラウンドレベルを確かめることの重要性も示唆された．急性のバイオアッセイシステムを利用して富山県内の事業所排水について評価を実施した楠井ら[4]の研究と比較すると，亜慢性影響であるためやや時間はかかるが，より低濃度・長時間曝露の影響も評価できる点で，本研究の短期慢性毒性評価システムは有用であると再確認された．なお，現在のUSEPAのTUc=1.0ではなく，最後に現在の環境基準と排水基準の比をとった10を希釈倍率のデフォルト値として規制を実施すると仮定した場合でも，AからEの5箇所全てで3種の生物のうち少なくとも1つの生物種で基準を上回った．このように，従来型の個別の化学物質管理では検出できない生物への影響について直接評価できるWETシステムについての有効性が明らかになった．今後，さらに情報収集を進め，国内導入に向けて試験法の設定や最適化，基準値の設定について今後の課題を少しずつクリアしていくことが求められる．

表-2 放流先ミキシングゾーン端での希釈倍率

	1回目	2回目
事業所A	27	29
事業所B	算出不能	310
事業所C	2.4	2.3
事業所D	算出不能	1.7
事業所E	5.5	5.9

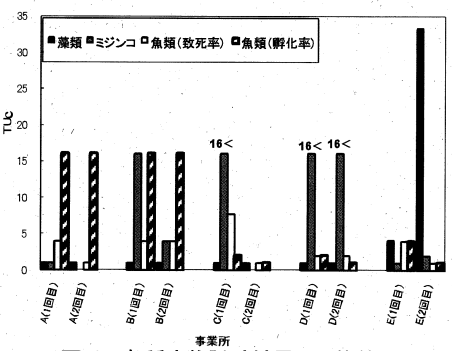

図-1 各種生物試験結果（TU換算）

謝辞：本研究は（財）河川環境管理財団の河川整備基金研究事業によって実施しました．この場を借りて感謝申し上げます．

参考文献

1) USEPA: Draft National Whole Effluent Toxicity (WET) Implementation Guidance, EPA 832-B-04-003, 2004.
2) Kim *et al.*: *Mar. Poll. Bull.*, Vol.57, pp.637-644, 2008.
3) 環境省：平成 21 年度環境省予算(案)主要新規事項等の概要, 2009.
2009.
4)楠井隆史ら：環境工学研究論文集, Vol.33, pp.215-226, 1996.
5)鑪迫典久：紙パルプ技術協会誌, Vol.55, pp.1110-1109, 2001.
6)内田弘美ら：第 17 回環境化学討論会講演要旨集, pp.244-245, 2008.
7)環境省：一律排水基準.
8) USEPA: EPA-821-R-02-013, Section 14, 2002.
9) USEPA: EPA-821-R-02-013, Section 13, 2002.
10) USEPA: EPA-821-R-02-013, Section 11, 2002.
11) OECD : OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICAL No.212, 1998.
12) Power, E. A., Boumphrey, R. S.: *Ecotoxicology*, Vol.13, pp.377-398, 2004.
13) 鑪迫典久ら：バイオサイエンスとインダストリー, Vol.67, pp.32-38, 2009.
14) 山本裕史ら：第 12 回日本水環境学会シンポジウム講演集, pp.47-48, 2009.
15)USEPA: Generalized Methodology for Conducting Industrial Toxicity Reduction Evaluations (TREs), EPA/600/2-88/070, 1989.